

## **OTKA 60723 pályázat zárójelentés**

### **Részletes szakmai beszámoló a pályázat munkaterve alapján**

#### **Kalpainok foszforilációjának vizsgálata**

Rekombináns fehérjékkel megvizsgáltuk a patkány m-kalpain, a humán kalpasztatin és a *Drosophila* kalpain B *in vitro* foszforilálhatóságát. Igazoltuk a kalpain m foszforilációját PKA-val, azonban az irodalmi adatokkal ellentétben nem sikerült bizonyítanunk a fehérje foszforilációját ERK1 és ERK2 protein kinázokkal. Az utóbbi negatív eredmények miatt ezt a fehérjét nem vizsgáltuk tovább. Előkísérletekben azt találtuk, hogy a kalpasztatint a PKA és ERK2 foszforilálja jól detektálható mértékben.

A *Drosophila* kalpainok foszforilációját korábban még nem írták le. Kísérleteinkben elsőként bizonyítottuk, hogy a kalpain B aktív és inaktív (mutáns) formája egyaránt foszforilálható PKA, ERK1 és ERK2 kinázokkal. Az előállított minták LC-MS/MS analízisével azonosítottuk az *in vitro* foszfoszforilációs helyeket. Meghatároztuk a kináz kezelések hatását a proteáz aktiválódási sebességére és aktivitására. Új eljárásokat vezettünk be a foszforilált fehérje aktivitásának és aktiválódásának többoldalú bizonyítására. Következtetéseink alátámasztására elvégeztük két fontos foszforilációs hely *in vitro* mutagenézisét, és megvizsgáltuk a mutáns fehérje enzimológiai sajátosságait. *Drosophila* S2 sejtek EGF kezelésével kalpain B *in vivo* foszforilációjának kimutatása alkalmas mintákat állítottunk elő, ami lehetővé tette az élő sejtekben foszforilálódó aminosav oldalláncok tömegspektrometriás meghatározását.

#### **Poliklonális antitestek előállítása *Drosophila* kalpainok vizsgálata céljából**

Rekombináns *Drosophila* kalpain A-val szemben nyulakban poliklonális antitestet állítottunk elő. Western blot és immunhisztokémiai kísérletekben bizonyítottuk, hogy az antitest alkalmas az antigén specifikus detektálására. Igazoltuk, hogy a kalpain A a 2. lárva stádiumban, illetve a kifejlett imágókban található meg a legnagyobb mennyiségben. Az antitestet a *Drosophila* kalpain A mutánsok tesztelésére is felhasználtuk.

Rekombináns *Drosophila* kalpain C ellen nyulakban poliklonális antitestet készítenünk. Az antitest felhasználásával igazoltuk, hogy a kalpain C fehérje elsősorban az

embriókban és a korai lárva stádiumokban fejeződik ki. Az antitestet lokalizációs kísérletek elvégzésére, illetve kalpain C RNS interferencia *Drosophila* törzsek ellenőrzésére is használtuk.

### **Drosophila protein foszfatázok vizsgálata**

Korábban azonosítottuk a *Drosophila* protein foszfatáz 1 CG9238 jelű glikogénköti alegységének homológját, melynek funkcionális vizsgálatára klasszikus és molekuláris genetikai kísérleteket végeztünk. Bebizonyítottuk, hogy a mutáns törzsekben nem történik meg a CG9238 gén expressziója. A mutáns jellemzése jelenleg is folyamatban van.

Az új típusú tesztisz specifikus PPY és PPN protein foszfatázok funkciójának meghatározására RNS interferencián alapuló kísérleteket végeztünk. Létrehoztuk a két gén csendesítésére alkalmas konstrukciókat, előállítottuk és jellemeztük a megfelelő transzformánsokat, majd különböző driver törzsekkel keresztezve indukáltuk az RNS interferenciát. Ha az aktív aktin drivert használtuk a transzgén állatok életképessége jelentősen csökkent. Kimutattuk, hogy a letalitás az erőteljes interferáló RNS expresszió miatt kialakuló off-target hatás következménye. A továbbiakban tesztisz specifikus expressziót biztosító driver törzset használtunk. Ily módon sikerült kizárnunk az off-target hatást. Azt tapasztaltuk, hogy transzgén *Drosophila* életképesek, jól detektálható fenotípust nem mutatnak. Feltételezzük, hogy a foszfatázok géncsendesítés miatti aktivitás csökkenését egyéb tesztiszben kifejeződő foszfatázok kompenzálják.

Az adatbankok bioinformatikai ellenőrzése során több új típusú protein foszfatáz gént találtunk. RT-PCR kísérletekkel igazoltuk, hogy a *PP1-Y1*, *PP1Y2*, *PPD5* és *PPD6* gének aktívak *Drosophila melanogaster*-ben, a génexpresszió a fejlődés késői stádiumaiban, a hím egyedek tesztiszében figyelhető meg. A hím specifikus génkifejeződést mutáns *Drosophila* felhasználásával erősítettük meg. Az új foszfatáz gének evolúciójának vizsgálatára további kísérleteket végzünk.

### **Kalpainok *in vivo* szubsztrátjainak azonosítása**

A kalpain funkció felderítéséhez elengedhetetlenül fontos a kölcsönható partnerek, így a kalpain szubsztrátok pontos ismerete. Szabályozó proteáz lévén, a kalpain különbözik az általános lebontó enzimektől. Az eddig ismert szubsztrátjait nagyrészt *in vitro*, mesterséges környezetben találták, ezért célul tűztük ki egy *in vivo* szubsztrátkeresési technika kidolgozását.

Kísérleteinkhez az S2 sejteket választottuk, melyekben először immunfestési eljárással igazoltuk a muslicában található két tipikus kalpain forma jelenlétét, majd az általunk korábban megtervezett és szintetizált kalpain szuperszubsztrát segítségével megmértük a sejtekben található kalpain aktivitásokat. A szubsztrátok kereséséhez három különböző módon kezelt S2 sejt csoportot hasonlítottunk össze. Egy kontoll mintát, melyben a sejteket nem érte semmilyen behatás, egy aktivált mintát, mely sejtekben található kalpaint aktiváltuk, és egy inhibítoros mintát, melyben specifikus kalpain inhibítort használva gátoltuk az enzimet. A kalpain aktiválásával és szelektív gátlásával olyan fehérjemennyiségbeli különbségeket kerestünk, mely kalpain hasításnak tudható be. Kísérleteink során 11 lehetséges kalpain szubsztrátot találtunk. A fehérjéket tömegspekrometria segítségével azonosítottunk, egy közülük ismert kalpain szubsztrát volt. A többi fehérje közül véletlenszerűen kiválasztottunk 4-et, melyeket klónoztunk és *in vitro* módszerekkel is igazoltuk, hogy valódi kalpain szubsztrátok.

### **Sejtpermeábilis kalpain szubsztrát kifejlesztése**

Az előző periódus alatt kifejlesztett szintetikus kalpain szubsztrát (Dabcyl-TPLKSPPPSPR-EDANS) a kísérleti eredmények alapján a jelenleg használt szubsztrátok közül a legjobbnak bizonyult, így megfelelő alapot adott egy sejtpenetráns változat elkészítésére. A szubsztrát C-terminális végére sejtpenetráns hepta-arginin tag-et kapcsoltunk, amelyet már számos munkában használtak különböző anyagok sejt belsejébe juttatására. Az így szintetizált szubsztrát nemhogy megtartotta szubsztrát mivoltát, hanem még jobb szubsztrátnak bizonyult a korábbi, nem sejtpenetráns változatnál. Fluoreszcens mikroszkópiával és áramlási citometriás eljárással vizsgáltuk a szubsztrát felvételét. Az oligoarginin tag-gel rendelkező szubsztrát nagyobb hatásfokkal jutott be COS7 sejtekbe, mint a normál változat. Az új, sejtpermeábilis kalpain szubsztrát fontos része lehet egy komplex, sejten belüli kalpain aktivitás-mérő módszernek.

### **Sejtpermeábilis kalpain aktivátor kifejlesztése**

Korábbi megfigyeléseink alapján, az inhibitor kalpasztatin egyes szerkezeti elemeinek felhasználásával (A és C szubdomének) a fenti metodika alapján membrán-permeábilis kalpain aktivátort állítottunk elő. Lásd alább.

## **Kalcium-mentes kalpain aktiválódás hatása az idegi ingerlékenységre**

A kalpasztatin A és C szubdoménje 19 aminosav hosszú fragmenseinek keveréke alacsony kalcium koncentráció mellett aktiválja a kalpainokat *in vitro*. A fragmensekhez oligo arginin tag-et kapcsolunk, amivel létrehoztunk egy sejtpерmeábilis *in vivo* kalpain aktiváló rendszert. A sejtpenetráns peptid szubsztát segítségével bizonyítottuk, hogy az aktivátor pár idegsejtekbe jutva aktiválja a kalpainokat agyszeletekben, *ex vivo*. A rendszer segítségével hippokampális és szomatoszenzoros kérgi szeleteket vizsgáltunk. A specifikus kalpain aktiválás hatására a hippokampális szeletekben az alap - ingerlékenység és az LTP szignifikáns növekedését tapasztaltuk. Ez a rendszer feltételezésünk szerint bármilyen emlős sejtekben használható, segítségével oly módon aktiválhatjuk a kalpainokat, hogy közben nem változtatjuk meg az intracelluláris kalcium szintjét.

### **A kalpain aktiválódás régió és időfüggésének elemzése**

A kalpain aktivátor pár hatására a koncentráció, illetve időfüggés szerint aktivitáscsökkenés is kialakult, feltehetően túlaktiváció miatt. Az aktiválódó sejtek számszerű változását vetettük össze a szomatoszenzoros kéreg és a hippocampus bizonyos régióiban. Eredményeink azt mutatták, hogy az aktiváció egy felfutási majd egy lecsengési szakaszt indukál, ahol a különböző agyi területek és ezek egyes régiói különböző mértékben aktiválódnak. Hasonló tendenciát láttunk mindkét agyterületen, de a hippocampusnál kisebb mértékben. A hippocampus esetében az 5. percben számoltuk a legtöbb erősen fluoreszkáló sejtet, míg a kéreg esetében a 10. percben. A hippocampusban eleve átlagosan magasabb jelölt sejtszámot tapasztaltunk, mint a kéreg rétegeiben. Ez jelentheti azt is, hogy a hippocampus hamarabb aktiválódik a kéreghez képest, amit korábbi elektrofiziológiai méréseink is alátámasztanak.

Mind a két agyterületen láttunk aktív sejteket már az aktivátor nélküli kontroll csoportokban is, ami valószínűleg a szeletelési beavatkozás következménye. Az adatfeldolgozáskor megfigyelhető volt a jelölt sejtek nemcsak számbeli, hanem intenzitásbeli változása is. Ezen különbségek pontos elemzését a későbbiekben még tervezzük. Az aktivátorral kezelt csoportoknál elmondhatjuk, hogy fokozatosan növekszik az aktív sejtek száma. A kéreg rétegeiben ez erőteljesebb, mint a hippocampus egyes régióiban, de ez utóbbinál is megfigyelhető. A hippocampus GD régiójában több jelölődést láthatunk, mint a CA3 vagy CA1 régiókban. Feltételezzük, hogy a GD érzékenyebben reagál, mint a hippocampus más régiói. Erre utalhat az is, hogy például epileptikus aktivitást generálva a GD magas aktivációt

mutat, a szemcsesejteknel aktív nyúlványburjánzás figyelhető meg. A dendritok átépülési folyamataiban pedig általában szerepet játszik a kalpain is. A szeletekről készült felvételeken láthatjuk, hogy a kalpain aktivitással rendelkező sejtek eloszlása nem egyenletes. A principális piramissejtek sem a kéreg, sem a hippocampus területén nem mutatnak erős jelölődést, ezért feltételezzük, hogy az erősen fluoreszkáló sejtek GABA-erg interneuronok, amire eloszlásukból és morfológiájukból következtethetünk. A GABA-erg sejtek gyors dendritátépülési folyamaton képesek átmenni, ami szintén bizonyíthatja a kalpain aktív működését a citoszolban. Az erős aktivitást mutató sejtek azonosítása folyamatban van immuncitokémiai módszerek alkalmazásával. Számos humán betegségben a kalpain rendellenes módon működik. A fokozott aktiváció rendszerint a sejtek elhalásához vezethet, idegrendszeri megbetegedések közül például a Parkinson kórban, Alzheimer betegségben és sclerosis multiplexben bizonyítottan szerepet játszik, főleg a másodrendű regulációs folyamatokban. A kalpain rendszer módosítása finom beavatkozási lehetőséget kínál a kóros folyamatok befolyásolására.

## **Calpain A, Calpain B és CalpainA/B mutáns *Drosophila* vonalak előállítása**

### **A *CalpA* gén**

A *CalpA* gén *in vivo* funkciójának tanulmányozásához két deléziós mutánst izoláltunk (*CalpA*<sup>634</sup> és *CalpA*<sup>808</sup>) - a génben ülő *P{SUPor-P}CalpA*<sup>KG05080</sup> P elem remobilizálásával - melyek molekuláris töréspontjait meghatároztuk. A *CalpA*<sup>634</sup> deléció csak a *CalpA* gént érinti, eltávolítja az első át nem íródó exont és az első intront, ez azonban nem befolyásolja a géntermék expressziós szintjét, s ennek megfelelően nem okoz fenotípus változást a vad típushoz képest. A *CalpA*<sup>808</sup> deléció az első át nem íródó exont, az első intron egy részét, valamint a *CalpA* gén promoter régióját távolítja el, érintve a szomszédos *hts* gén szabályozó szakaszát is. A *CalpA*<sup>808</sup> homozigóta mutáns életképes, de nőstény-steril, a CalpA fehérje nem mutatható ki benne Western blottal. A *CalpA* gént teljesen eltávolító *Df(2R)ED3716* delécióval létrehozott *CalpA*<sup>808</sup> hemizigóta nőstények fertilisek, amiből arra lehet következtetni, hogy a nőstény-sterilitást a *hts* gén érintettsége okozza. A nőstények által lerakott peték 10%-ában a dajkasejtek citoplazma-transzportjának hiányossága mutatható ki, ami annak a következménye, hogy a *Df(2R)ED3716*) deléció is érinti a *hts* gént.

Eredményeink arra utalnak, hogy *Drosophilában* a *CalpA* nem esszenciális gén, hiánya nem okoz letalitást vagy sterilitást.

A *CalpA* fehérje elleni specifikus ellenanyag segítségével kimutattuk, hogy a *CalpA* az egyedfejlődés minden szakaszában jelen van, és a sejteken belül elsősorban a kortikális aktin sejtíváz mentén helyezkedik el.

### **A *CalpB* gén**

A *P{EPgy2}CalpB<sup>EY08042</sup>* P elem segítségével három intragénikus deléció (*CalpB361*, *CalpB502*, *CalpB505*) hoztunk létre a *CalpB* génben. A molekuláris töréspontok meghatározása mellett, Western blot és RT-PCR segítségével kimutattuk, hogy ezekben a mutánsokban a *CalpB* génről nem képződik géntermék. Ezek a *CalpB* mutánsok teljesen életképesek és fertilisek. Mivel a korábbi vizsgálataink kimutatták, hogy a *CalpB* fehérje jelentős mennyiségben fejeződik ki a petekamrák follikuláris- és határsejtjeiben (Farkas et al. Biochem. J. (2004) 378, 299), megvizsgáltuk, hogy a *CalpB* fehérje hiánya okoz-e változást a határsejtek vándorlásában. Mind a három *CalpB* mutánsban a határsejtek vándorlása a vad típushoz képest lassabb. A *CalpB361* mutánsban a petekamrák 38%-ában mutatható ki a határsejtek késése, ez az érték a *CalpB502* és a *CalpB505* mutánsok esetében 27% illetve 32%. Ezt a vándorlási késést egy, a *CalpB* gént hordozó P elem helyreállítja, annak jeleként, hogy az észlelt fenotípust a *CalpB* fehérje hiánya hozza létre. A *CalpA* gén nem vesz részt a határsejtvándorlás szabályozásában, mert a *CalpA<sup>808</sup>/Df(2R)ED3716* transz-heterozigóta petekamrákban nem találtunk vándorlási késést. Specifikus Gal4 forrást (*slbo-Gal4*) használva, RNS interferencia segítségével csendesítettük a *CalpA* és *CalpB* gének expresszióját a határsejtekben. A *CalpA* gén csendesítése nem okozott határsejtvándorlási fenotípust, míg a *CalpB* gén esetében a mutánshoz hasonló késést figyeltünk meg. Ezek az eredmények megerősítik a mutánsokkal kapott adatokat, és egyben arra is utalnak, hogy a *CalpB* génre a határsejtekben van szükség a vándorlás során.

A vándorlás során a sejtek nyúlványokat fejlesztenek, melyek fokális adhéziók segítségével rögzülnek az extracelluláris mátrixhoz. A sejtek elmozdulásának feltétele, hogy a mozgás irányával ellentételes oldalon a régi fokális adhéziók megszűnjenek. Emlős sejtek esetében igazolt a calpainok szerepe a fokális adhéziók lebontásában. A fokális adhéziók létrejöttében kulcsszerepe van az Integrin és a Talin fehérjéknek. *Drosophilában* az alfaIntegrint az *if*, a

béta integrin a *mys* és a Talin a *rhea* gének kódolják. Ezek szerepét a határsejtek vándorlásában RNS interferencia segítségével vizsgáltuk: a *mys* gén csendesítése a petekamrák 31%-ában hoz létre sejt vándorlási késést, míg ez az érték a *rhea* és az *if* gének esetében 26% illetve 31%. Mivel az *if*, a *mys* és a *rhea* gének csendesítése hasonló sejt vándorlási fenotípust hoz létre mint a *CalpB* mutációk, feltételezhető, hogy közös szabályozási folyamatban vesznek részt a határsejtekben. Ezt a lehetőséget genetikai kölcsönhatások segítségével tanulmányoztuk. Homozigóta *CalpB505* mutáns háttérén csendesítettük az *if*, a *mys* és a *rhea* géneket a határsejtekben. RNS interferencia segítségével Mind a három esetben fokozódott a vándorlási fenotípus: az *if* gén esetében 22%-al, a *mys* génnél pedig 17%-al több petekamrában mutatkozott késés, mint a *CalpB505* mutánsban, ami genetikai kölcsönhatásra utal. Legerősebb kölcsönhatást a *rhea* génnel tapasztaltunk, ebben az esetben 30%-al több petekamra mutatott határsejt vándorlási késést a *CalpB505* mutánsához képest. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a *CalpB* hatással van az *if*, a *mys* és a *rhea* gének funkciójára a határsejtek vándorlása során. Eredményeinkből arra lehet következtetni, hogy a *CalpB* gén fontos szerepet játszik a határsejt vándorlásban, és ezt a funkcióját az Integrin és Talin fehérjékkel kölcsönhatva, a fokális adhéziók szabályozásán keresztül valósítja meg.

### **Calpain A, Calpain B, CalpainA/B és Calpain C RNS interferencia vonalak előállítás**

Előállítottunk transzgenikus RNS interferencia vonalakat a *calpain A* (*calpA<sup>RNSi</sup>*) a *calpain B* (*calpB<sup>RNSi</sup>*) és a *calpain C* (*calpC<sup>RNSi</sup>*) génekre, és elvégeztük jellemzésüket.

Kimutattuk, hogy a *calpA<sup>SZ3979</sup>* és *calpB<sup>EP972</sup>* P-elem inszerciós mutánsok a várakozással ellentétben nem hipomorfok, hanem hiper morfok. A homozigóta *calpA<sup>SZ3979</sup>* állatok életképesek, és fertilisek, míg a *calpB<sup>EP972</sup>* homozigóták életképesek, de csökkent fertilitást mutatnak. Mivel a két fehérje felépítése hasonló egymáshoz, ezért felmerült annak a lehetősége, hogy funkciójuk redundáns. Ezt *calpA<sup>SZ3979</sup>* - *calpB<sup>EP972</sup>* kettősmutáns előállításával és fenotípus-analízisén keresztül vizsgáltuk. A *calpA<sup>SZ3979</sup>* - *calpB<sup>EP972</sup>* kettősmutánsok szintetikus személetalitást mutatnak, és az adult kort elérő állatok nőtény sterilek. Ez a genetikai interakció legalább részleges redundanciát igazol a CalpA és CalpB fehérjék között.

Előállítottunk *UAS-calpA* és *UAS-calpB* transzgenikus vonalakat is, amelyek lehetővé teszik a két fehérje GAL4-függő túltermelését az egyedfejlődés folyamán. Transzkripciós szinten kimutattuk a túltermelés tényét *actin5C-GAL4* driveres indukciót követően. A CalpA és

CalpB túltermelés nem eredményezett látható fenotípus változást, és mind az egyes, mind pedig a kettős túltermelő állatok életképeseknek és fertiliseknek bizonyultak.

Előállítottunk *calpA<sup>RNSi</sup>* és *calpB<sup>RNSi</sup>* transzgenikus RNS interferencia (RNSi) vonalakat, amelyek lehetővé teszik a két gén expressziójának gátlását az egyedfejlődés folyamán. Kimutattuk, hogy *actin5C-GAL4* driveres indukciót követően kb. 10 %-ra csökken a *calpA* és *calpB* gének expressziója ezekben a vonalakban. A *calpA* és *calpB* gének funkciójának kiesése nem okozott látható fenotípus változást még a *calpA<sup>RNSi</sup>* - *calpB<sup>RNSi</sup>* kettős-RNSi esetében sem.

Vizsgáltuk a különböző calpain mutánsok eltérő stressz hatásokkal szembeni érzékenységét, és apoptotikus fenotípusát is. Nem tudtunk kimutatni a vad típustól eltérő apoptózist a *calpA* és *calpB* mutánsokban, a túltermelő és RNSi vonalakban sem. Stressz hatások közül az oxidatív, alacsony és magas hőmérséklet, extrém PH, nehézfémek és éheztetés hatását vizsgáltuk. Sem a *calpA* és *calpB* mutánsok, sem pedig a túltermelő és RNSi vonalak nem mutattak a vad típustól eltérő érzékenységet, vagy rezisztenciát a vizsgált stressz-hatásokra. Akkor sem tapasztaltunk eltérést, ha mindkét gén expresszióját egyszerre gátoltuk, vagy egyszerre túlhajtottuk.

Ismert, hogy fonalférgek neurodegenerációs folyamataiban aszpartil-proteázok és calpainok is részt vesznek. Megvizsgáltuk ezért, hogy calpain hiányos és túltermelő vonalak mutatnak-e vad típustól eltérő érzékenységét neurodegenerációt indukáló szerekkel szemben. Először 6-hydroxidopamin (6-OHDA) hatását vizsgáltuk, majd pedig thapsigarginra tértünk át, mivel a 6-OHDA gyorsan elbomlott a kísérletekben. Ezek a kísérleteink még folyamatban vannak.

Noha a *calpain C* gén (*calpC*) katalitikusan inaktív fehérjét kódol, megvizsgáltuk, hogy expressziójának gátlása okoz-e fenotípus változást. A vizsgálatokhoz transzgenikus RNS interferencia vonalakat állítottunk elő (*calpC<sup>RNSi</sup>*), és a *calpC* csendesítését *actin5C-GAL4* driverrel indukáltuk. Meghatároztuk, hogy specifikus RNS-interferencia a *calpC* gén expressziójának mintegy ~90%-os csökkenését és polifázisos letalitást eredményez a *calpC<sup>RNSi</sup>* transzgenikus állatok egyedfejlődésének báb stádiumában. A *calpC* gén tehát ellentétben a *calpA* és *calpB* génekkel létfontosságú funkciókért felelős.

Az *actin5C-GAL4* driver általánosan, minden szövetben gátolja a génexpressziót, ezért 18 szövet-specifikus driverrel is megismételtük a géncsendesítési kísérletet. Ezek közül négy driver, a trachea specifikus *btl-GAL4*, az imágókorong specifikus *dll-GAL4*, az izom specifikus *24B-GAL4* és a glia specifikus *repo-GAL4* eredményezett késő letalitást az RNSi indukcióját követően. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a calpain C fehérjének ezekben a szövetekben lehet létfontosságú szerepe. A gén funkcionális vizsgálata jelenleg is folyik.



### **A pályázatban szereplő, csak részben megvalósult projektek**

A kalpain hasítóhelyek módosítása a *Drosophila* PKC-ben és PKD-ben, illetve ezek hatása a memória folyamatokra projekt megvalósítása csak részben sikerült, ugyanis a rendelkezésünkre álló metodikák alapján nem sikerült használható fehérje preparátumokat készítenünk. Az együttműködőkkel egyeztetve ezt a kutatási tervet elvetettük.

A kalpain szubsztrátok proteomikai azonosítása különféle sejtekben, továbbá a sejtciklus szabályozásában részt vevő kalpain szubsztrátok azonosítása még nem történt meg, a kidolgozott módszer azonban a jövőben lehetőséget ad erre.

Az axon degenerációs modell kidolgozása a kalpain aktivátorok és inhibitorok hatására még folyamatban van, a jelentésben ismertetett idegi ingerlékenységgel kapcsolatos eredmények ennek a kísérlet sorozatnak az előfutárai.

